



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 48/00, 9/127, 31/70, 35/76, 47/02, 47/32, 47/34, 47/36, 47/42</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/02047</p> <p>(43) 国際公開日 1997年1月23日(23.01.97)</p>																		
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01824</p> <p>(22) 国際出願日 1996年7月2日(02.07.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/167744 1995年7月3日(03.07.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 高研(KOKEN CO., LTD.)(JP/JP) 〒161 東京都新宿区下落合3丁目5-18 Tokyo, (JP) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 寺田雅昭(TERADA, Masaaki)(JP/JP) 〒177 東京都練馬区関町南2丁目17番14号 Tokyo, (JP) 落谷孝広(OCHIYA, Takahiro)(JP/JP) 〒104 東京都中央区築地5丁目1番1号 国立がんセンター築地宿舎218号室 Tokyo, (JP) 宮田暉夫(MIYATA, Teruo)(JP/JP) 〒161 東京都新宿区下落合3丁目6番29号 Tokyo, (JP)</p>	<p>伊藤 博(ITO, Hiroshi)(JP/JP) 〒171 東京都豊島区雑司が谷3丁目3番25号-1006 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 青山 茂, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユー ラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>																			
<p>(54)Title: GENE PREPARATIONS</p> <p>(54)発明の名称 遺伝子製剤</p> <div data-bbox="446 1192 1079 1627"> <table border="1"> <caption>Approximate data from the graph</caption> <thead> <tr> <th>注入後日数 b</th> <th>試験例 1 c (血小板数 a)</th> <th>比較例 1 d (血小板数 a)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>150</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>150</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>280</td> <td>250</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>270</td> <td>150</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>250</td> <td>130</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>a ... No. of platelets (<math>\times 10^4 \mu l</math>)</p> <p>b ... Days elapsed after injection</p> <p>c ... Test Ex. 1</p> <p>d ... Comp. Ex. 1</p> <p>(57) Abstract Gene preparations comprising desired genes or vectors containing desired genes integrated therein and carriers for supporting the same</p>			注入後日数 b	試験例 1 c (血小板数 a)	比較例 1 d (血小板数 a)	0	150	150	10	150	150	20	280	250	30	270	150	40	250	130
注入後日数 b	試験例 1 c (血小板数 a)	比較例 1 d (血小板数 a)																		
0	150	150																		
10	150	150																		
20	280	250																		
30	270	150																		
40	250	130																		

(57) 要約

所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AI	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド		ウクライナ共和国	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モロッコ	TR	トルコ
CH	スイス	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CN	中国	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
		KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

## 明 細 書

## 遺伝子製剤

発明の属する技術分野

本発明は、医療分野、特に遺伝子治療に関する。特に本発明は、生体内に投与した時に遺伝子ベクターまたは遺伝子を安定に保持、徐放し、長期間にわたりその治療効果を持続させることができ、また希望するときに治療の終了を可能にすることができる遺伝子製剤に関する。

従来の技術

近年、遺伝子治療に関する基礎研究が盛んに試みられるようになってきており、またその治療への期待は大変に大きいものである。遺伝子治療とは遺伝子を薬剤とし疾患を治療するもので、目的の酵素、サイトカイン等の遺伝子を患者の細胞内に導入し、その遺伝子により体内に目的とする物質が産生され疾患の治療を行うものである。この遺伝子治療は大きく2つに分けることができ、1つは目的の遺伝子を患者染色体内に組み込み、半永久的にその遺伝子の発現を期待するもので、もう1つは染色体に組み込まれることは期待せず一過性の発現を期待するものである。このうち後者の遺伝子治療では、例えば癌細胞に対する免疫能を高めるサイトカイン等の遺伝子を体内に導入する方法としてアデノウィルス等による方法がよく用いられている (Cardiovascular Research, 28, 445 (1994); Science, 256, 808 (1992); Gastroenterology, 106, 1076 (1994); TIBTECH, 11, 182 (1993); J. Biol. Chem, 266, 3361 (1991); Nature Medicine, 1, 583 (1995) およびこれらの引用文献)。

ウィルスベクターを用いた場合は、遺伝子の導入効率が一般に高いが、

免疫反応のために複数回投与が困難である (J. Biol. Chem., 269, 13695 (1994)、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 10, 369 (1994))。

有機薬剤又はタンパク製剤をコラーゲンを用いて徐放させる製剤についてはJ. Controlled Release 33, 307-315 (1995)等に記載されている。しかし、ここに記載されている通常の薬物 (例えばタンパク性薬剤、化学合成された薬物等) を例えばゲル状のコラーゲンに担持させた場合は1日～2日程度で薬剤が溶け出す。

#### 発明が解決しようとする課題

現在遺伝子治療として行われている遺伝子ベクター (遺伝子を組み込んだベクター) または遺伝子をそのまま投与する方法では、遺伝子ベクターまたは遺伝子は投与後直ちに細胞と接触し、直ちに遺伝子導入が開始されすぐに完了する。また、細胞内に入った遺伝子は細胞分裂によって希釈 (コピー数が減少) あるいは細胞内での分解によって減少する。従って、導入された遺伝子の発現は数週間程度しか持続することができず、十分に治療するには短かすぎることが欠点となっている。そのため何回かの遺伝子ベクターまたは遺伝子の投与が必要になっている。従って、本発明が解決しようとする課題は、これらの欠点を克服し長期にわたりその治療効果を持続させることができる遺伝子ベクターまたは遺伝子を徐放できる製剤を提供することにある。

また、ウィルスベクター等を用いた遺伝子治療は複数回投与が困難であるため、それを可能にする方法が望まれている。そこで、本発明が解決しようとする第2の課題は、ウィルスベクター等を用いた遺伝子治療において複数回投与を可能にする遺伝子製剤を提供することにある。

また、遺伝子はタンパク製剤に比べれば数週間と長期に発現するので安全性確保のため、遺伝子の体内における発現をいつでも中止できるように

しておくことが望ましい。そこで、本発明が解決しようとする第3の課題は、治療終了を希望する場合には遺伝子導入を直ちに止めることができる遺伝子製剤を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、遺伝子ベクターまたは遺伝子を徐放させる製剤を種々検討した結果、遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤を生体に投与したところ、意外にも遺伝子が数か月以上にわたっても発現されることを見出し、さらに本製剤は生体内で複数回投与が可能であることを見出して、本発明を完成した。

すなわち、本発明の要旨は、以下の通りである。

- (1) 遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤。
- (2) 生体親和性材料が、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、またはグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、またはこれらの生体親和性材料の2種類以上の混合物である(1)記載の遺伝子製剤。
- (3) 遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、コラーゲンを含む生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤。
- (4) 遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、コラーゲンからなる担体に担持させた遺伝子製剤。
- (5) 遺伝子製剤を生体内に入れた状態において、その状態の遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量が、0.01～30w/w%である(1)記載の遺

伝子製剤。

(6) 溶液状、懸濁液状、含水のゲル状、フィルム状、スポンジ状、棒状、または球状である(1)記載の遺伝子製剤。

(7) ベクターが、ウィルスベクター、リポソームベクター、またはウィルスとリポソームによる融合リポソームベクターである(1)記載の遺伝子製剤。

(8) ベクターが、ウィルスベクターである(1)記載の遺伝子製剤。

(9) ベクターが、アデノウィルスベクターである(1)記載の遺伝子製剤。

(10) 遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させ、その担持させたものをその遺伝子ベクターまたは遺伝子が透過できる容器に入れた遺伝子製剤。

以下に本発明を詳細に説明する。

「遺伝子を組み込むベクター」としては、遺伝子を細胞内に導入できるものであればいかなるものでもよく、例えばウィルスベクター、リポソームベクター、またはウィルスとリポソームによる融合リポソームベクター等が挙げられる (Cardiovascular Research, 28, 445 (1994); Science, 256, 808 (1992); Gastroenterology, 106, 1076 (1994); TIBTECH, 11, 182 (1993); J. Biol. Chem, 266, 3361 (1991); Nature Medicine, 1, 583 (1995) およびこれらの引用文献)。

ウィルスベクターとしては、遺伝子治療において通常のベクターとして用いられるものが使用でき、例えばアデノウィルス、アデノ関連ウィルス、ワクシニアウィルス、レトロウィルス、HIVウィルス、ヘルペスウィルス等を用いることができる。例えば上述の文献記載の通常の方法等に従って、導入する遺伝子をウィルスベクターに直接組み込むことで、遺伝子ベクターを調製することができる。

リボソームベクターとしては、遺伝子治療において通常のリボソームベクターとして用いられるものが使用でき、例えばDOTMA、DOPE、DOGS等を混合して調整したものが使用できる。カチオニックリボソームベクターを用いた場合、細胞内への導入効率が高い。ウィルスとリボソームによる融合リボソームベクターとしては、例えばセンダイウィルス（H V J : hemagglutinating virus of Japan）とリボソームの融合リボソームベクター等が挙げられる。例えば上述の文献記載の通常の方法等に従って、導入する遺伝子をリボソームベクターまたは融合リボソームベクターの内部に封入することで、遺伝子ベクターを調製することができる。封入する遺伝子の形態としては、生体内で遺伝子を発現できればいかなる形態でもよいが、好ましくは生体内で安定なものがよく、例えばプラスミド等がよい。

遺伝子を細胞内に導入する「遺伝子を組み込むベクター」に組み込まずに、遺伝子そのものを、本発明の遺伝子製剤に担持させることもできる。その場合には、遺伝子の形態としては、生体内で遺伝子を発現できればいかなる形態でもよく、例えば、いわゆる発現ベクター等に組み込んでもよい。好ましくは生体内でもより安定なものがよく、例えばプラスミド等がよい。

導入する「遺伝子」については、遺伝子治療が可能な遺伝子であればいずれでもよく、例えばアデノシンデアミナーゼ遺伝子、GM-CSF遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子等が挙げられる。

「生体親和性材料」としては、生体親和性に優れ、遺伝子ベクターまたは遺伝子を生体内で安定に保持できるものが好ましい。生体親和性材料としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン

酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、またはグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、またはこれらの生体親和性材料の2種類以上の混合物等が挙げられる。特に好ましい生体内親和性材料としては、コラーゲンが挙げられ、このコラーゲンに上記他の生体親和性材料を混合することも好ましい。コラーゲンとしては、いかなるものも使用できるが、例えば酸可溶性コラーゲン、酵素可溶化コラーゲン（例えばアテロコラーゲン等）、アルカリ可溶化コラーゲン、側鎖を修飾したコラーゲン、架橋したコラーゲン、遺伝子工学的に製造したコラーゲン等を用いることができる。側鎖を修飾したコラーゲンとしては、例えばサクシニル化またはメチル化したコラーゲン等が挙げられ、架橋したコラーゲンとしては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソアナートまたはポリエポキシ化合物等で処理したコラーゲン等を挙げることができる（フレグランス・ジャーナル 1989-12, 104-109、特公平 7-59522号公報）。

また、遺伝子ベクター等の安定化、遺伝子の細胞内若しくは核内への導入促進、または遺伝子ベクター等の放出制御のために、必要に応じて「添加剤」を加えることができる。添加剤としては、かかる目的を達成する添加剤を使用できるが、例えば、ショ糖、グリシン、コンドロイチン硫酸、ゼラチン、アルブミン、サイトカイン、HMG-1, -2 混合物(High Mobility Group-1, -2 Mixture; 実験医学, 12, 184 (1994)、BIOTHERAPY, 8, 12 65 (1994))、クロロキン、ポリリジン(Hepatology, 22, 847 (1995))、トランスフェクタム（登録商標、和光純薬工業株式会社）等が挙げられる。

コラーゲンに他の生体親和性材料または添加剤を混合する場合は、そのうちのコラーゲン等の含量は10w/w%以上がよく、好ましくは30w



／w%以上の範囲が挙げられ、さらに好ましくは50 w/w%以上の範囲が挙げられ、特に好ましくは70 w/w%以上の範囲が挙げられる。

遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量は、遺伝子ベクターまたは遺伝子の大きさ、種類等、および生体内親和性材料の種類等により変わる。

好ましい遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量は、遺伝子製剤を生体内に入れた状態において、その状態の遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量が、0.01～30 w/w%となる遺伝子製剤が挙げられ、さらに好ましくは、0.05～10 w/w%となる遺伝子製剤が挙げられ、特に好ましくは、0.05～5 w/w%となる製剤が挙げられる。

また、遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量は、製剤の形態により変化する。例えば、生体親和性材料としてコラーゲンを用いる場合を例として、以下にその含量の好ましい範囲を説明する。

製剤の形態がゲル状であれば、好ましいコラーゲンの含量は、0.01～25 w/w%の範囲が挙げられ、さらに好ましくは、0.05～10 w/w%の範囲が挙げられ、特に好ましくは、0.05～5 w/w%の範囲が挙げられる。ただし、コラーゲンの含量を2%以上の範囲とする場合は、コラーゲンに対し5～900 w/w%の添加剤を加えるのが好ましい。

製剤の形態がフィルム状であれば、好ましいコラーゲンの含量は、乾燥前のコラーゲンの含量として、0.2～30 w/w%の範囲が挙げられ、さらに好ましくは0.3～5 w/w%の範囲が挙げられ、特に好ましくは、0.4～2 w/w%の範囲が挙げられる。ただし、コラーゲンの含量を1%以上の範囲とする場合は、コラーゲンに対し5～900 w/w%の添加剤を加えるのが好ましい。

製剤の形態が棒状の固体であれば、好ましいコラーゲンの含量は、乾燥前のコラーゲンの含量として、10～30 w/w%の範囲が挙げられ、コ

ラーゲンに対し5～100w/w%の添加剤を加えるのが好ましい。

本発明にかかる遺伝子製剤の形状は、特に制限はなく、溶液状、懸濁液状、含水のゲル状、フィルム状、スポンジ状、棒状、球状等が挙げられる。ただし、好ましい形状は、遺伝子を組み込むベクターまたは遺伝子の種類、大きさ等により変わるが、一般に、液状、懸濁液状、含水のゲル状等の形状が挙げられる。

遺伝子製剤の製造方法は、遺伝子製剤を生体内に入れた状態において、その状態の遺伝子製剤の中の生体親和性材料が上記の好ましい範囲内の含量になるように製造する。

溶液状、懸濁液状および含水のゲル状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば、(1) 必要に応じて添加剤を添加した溶液状またはゲル状の担体に、遺伝子ベクターもしくは遺伝子（以下、遺伝子ベクター等という）の粉末、溶液、懸濁液またはゲルを混合する方法、(2) 必要に応じて添加剤を添加した粉末状の担体に、遺伝子ベクター等の溶液、懸濁液またはゲルを浸透する方法、(3) 必要に応じて添加剤を添加したスポンジ状担体に、遺伝子ベクター等の溶液、懸濁液またはゲルを浸透させ、練合する方法等を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

固体状の遺伝子製剤の製造方法としては、例えば(1) 必要に応じて添加剤を添加した溶液状またはゲル状の担体に、遺伝子ベクター等の粉末、溶液、懸濁液またはゲルを混合し、乾燥する方法、(2) 必要に応じて添加剤を添加した粉末状の担体に、遺伝子ベクター等の粉末、溶液、懸濁液またはゲルを混合し、乾燥する方法、(3) 必要に応じて添加剤を添加したスポンジ状の担体に、遺伝子ベクター等の溶液、懸濁液またはゲルを浸透させ、乾燥する方法、(4) 必要に応じて添加剤を添加したスポンジ状担体に、遺伝子ベクター等の溶液、懸濁液またはゲルを浸透させ、そのまま乾燥する

か、または必要に応じて水等を加えた後、練合し、乾燥する方法、(5) (1)～(4)の方法で得られる固形物を粉碎し、圧縮成形する方法、(6) 必要に応じて添加剤を添加した粉末状の担体と遺伝子ベクター等の粉末を混合し、圧縮成形する方法等を挙げることができるがこれに限定されるものではない。なお、乾燥方法、乾燥時の温度および湿度、混合方法、混合時の温度および湿度、圧縮成形方法、圧縮成形時の温度、湿度、圧縮圧力、担体溶液、遺伝子ベクター溶液の溶液粘度、担体と遺伝子ベクター溶液の混合溶液粘度、pHについては通常の方法と同様に行うことができる。

本発明にかかる遺伝子製剤は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じ、種々の方法で投与することができる。例えば皮下、筋肉内等に投与することができ、また腎臓、肝臓、肺、脳等の疾患の対象部位に直接投与することができる。疾患部位に直接投与すれば臓器選択的に治療することができる。

本発明では、生体親和性材料として生分解性の材料を用いる場合には、投与後その生体親和性材料を体内より取り出す必要はなく、さらに繰り返し投与することも可能になる。

他方、疾患の種類あるいは病状によって遺伝子導入の中止を希望する場合には、遺伝子製剤をそのまま取り出すことが可能であり、遺伝子導入を中止することができる。例えば遺伝子製剤が固形状態であれば手術等によって取り除くか、あるいはウィルスが自由に通過可能なポアサイズを持った容器等に遺伝子ベクター等を入れた遺伝子製剤を用いて遺伝子治療を行い、治療を中止する際にはその容器等を取り除くことができる。具体的には、例えば、特願平3-120115号（国際公開番号WO92/20400号）記載の容器（チューブ）を用いて実施できる。

#### 実施例

##### 実施例 1

線維芽細胞増殖因子HST-1 (FGF4) の遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2980-2984 (1987) に記載の方法に従って調製した) を組み込んだアデノウィルス (Adexl HST-1 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 12368 (1994))  $10^9$  pfu (plaque forming unit) を含む培養液 0.9 ml をアテロコラーゲンの中性溶液 ((株) 高研製アテロコラーゲンインプラント : 2%アテロコラーゲン溶液) 0.1 ml と混合することで、遺伝子製剤を作成した。尚、上記アデノウィルス (Adexl HST-1) は、アデノウィルス type 5 (ATCCカタログNo. VR-5) を、J. Viro 1, 54, 711-719 (1985) またはProc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320 (1996)、およびCell 13, 181-188 (1978)に従って操作してE1A、E1B およびE3の一部を欠失させ、この非増殖型ウィルス遺伝子に上記Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 91, 12368 (1994)の記載に従って線維芽細胞増殖因子HST-1の遺伝子を組み込むことによって得ることができる。

#### 実施例 2

2%アテロコラーゲンの中性溶液 0.1 ml と Adexl HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液 0.9 ml を混合後、37℃に保温することで、ゲル状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 3

アテロコラーゲンの中性溶液を凍結乾燥して作成したスポンジを5mm角程度に細かくし、そのスポンジを Adexl HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液 1 ml に加え一晩放置することで、遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 4

実施例 2 で調製するゲル状の遺伝子製剤を凍結乾燥することで、遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 5

実施例 3 で調製する遺伝子製剤を再度凍結乾燥し、その乾燥するスポンジを棒状に圧縮することで、ペレット（棒状圧縮物）の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 6

線維芽細胞増殖因子 HST-1 (FGF 4) をサイトメガロウィルス (CMV) プロモーターを持つ発現ベクター (pRC/CMV) に組み込んだプラスミドベクターをリポソーム (DMRIE-C (GIBCO-BRL 社製)) と混和し、そのリポソームを含む液を、同量のアテロコラーゲンの中性溶液と混合することで、遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 7

Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液 1 ml をアルギン酸の 1 % 溶液 1 ml と混合する。そのベクター含有アルギン酸溶液をノズルより塩化カルシウムの 0.5 % 溶液に滴下し、直径約 1 mm のビーズを得、遠心により集めることで、ビーズ状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 8

Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液 1 ml を 45 °C に加温したアガロースゲルの 5 % 溶液 1 ml と混合する。その混合液をノズルより 10 °C の PBS 溶液に滴下し直径約 1 mm のビーズを得、遠心により集めることで、ビーズ状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 9

実施例 1 で作成した遺伝子製剤をポリエステルよりなる袋（人工血管を袋としたもの）（マイクロン（登録商標、インターバスキュラー社製））に入れることで、遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 10

実施例 1 と同様にして、Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液を、ア

テロコラーゲン濃度として最終0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 w/w %となる様に、アテロコラーゲンの中性溶液と混合し、1 ml の遺伝子製剤を作成した。

#### 実施例 1 1

プラスミド p O G 4 4 (Stratagene社にて購入) を  $73.25 \mu\text{g/ml}$  の濃度で含む水溶液 5 ml をアテロコラーゲンの酸性溶液 (2 %アテロコラーゲン含有、pH 3.5) 5 g と混合し、凍結乾燥してスポンジを作成する。このスポンジにアテロコラーゲン濃度として、0.4、2、5、10、20 w/w %となるように蒸留水を加えることで、ゲル状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 1 2

プラスミド p O G 4 4 を  $73.25 \mu\text{g/ml}$  の濃度で含む水溶液 5 ml をアテロコラーゲンの酸性溶液 5 g または 2.5 g と混合し、これにヒト血清アルブミン水溶液 ( $80 \text{mg/ml}$ ) を  $260 \mu\text{l}$  あるいは  $640 \mu\text{l}$  を加えて混合し、凍結乾燥してスポンジを作成する。このスポンジにアテロコラーゲンとヒト血清アルブミンを合わせた量の濃度として、10 w/w %となるように蒸留水を加えることで、ゲル状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 1 3

実施例 1 1 で調整するゲル状の遺伝子製剤をガラス上に伸展して徐々に乾燥させることで、フィルム状の遺伝子製剤を作成する。

#### 実施例 1 4

実施例 1 1 または 1 2 で調整するゲル状の遺伝子製剤を棒状に押し出し成形し、徐々に乾燥させることで、棒状の遺伝子製剤を作成する。

#### 比較例 1

Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液 1 ml をマウス腹腔に投与したところ、投与後約 12 日目より血小板数が約 2 倍に増加し、その効果は 20～30 日にわたり持続した。また末梢血中の HST-1 は最大 50 ng/ml の濃度が投与後 20 日目に得られたが、後述する実施例 1 の製剤の様に一定の濃度を保つことはできず、60 日後には血中で検出不可能となった。結果を図 1、2 に示した。

#### 試験例 1

実施例 1 で作成した遺伝子製剤 1.0 ml をマウス腹腔に投与したところ、投与後約 12 日目より血小板数が約 2 倍に増加し、その効果は 50 日以上にわたり持続した。また末梢血中の HST-1 は 80 日以上にわたり 20 ng/ml の濃度が持続した。結果を図 1、2 に示した。

#### 試験例 2

実施例 2 で作成する遺伝子製剤 1.0 ml をマウス腹腔に投与すると、投与後約 12 日目より血小板数が約 2 倍に増加し、その効果は 60 日以上にわたり持続する。

#### 試験例 3

実施例 3 で作成する遺伝子製剤をマウス腹腔に投与すると、投与後約 12 日目より血小板数が約 2 倍に増加し、その効果は 60 日以上にわたり持続する。

#### 試験例 4

実施例 1 で作成した遺伝子製剤をマウス腹腔内に投与し、投与後 3 日後に取り出した。その結果、投与後約 12 日目に血小板数が約 2 倍に増加し、その後減少し、約 25 日目に正常値に戻った。その結果を図 3 に示した。

#### 試験例 5

実施例 1 で作成した遺伝子製剤をマウス腹腔内に投与し、投与後 3 日目

に取り出し、投与後20日目に再び実施例1で作成した遺伝子製剤を投与した。その結果、投与後約12日目に血小板数が約2倍に増加し、その後減少し、約20日目に正常値に戻り、その後直ちに血小板数が約2倍に増加し、その効果は初回投与後40日以上にわたり持続した。その結果を図4に示した。

#### 試験例6

実施例10で作成した5種の遺伝子製剤、およびコラーゲンをまったく含まない Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液1mlをマウス腹腔内に投与し、投与後5日目の末梢血中のHST-1タンパク濃度を測定した。その結果を図5に示した。その結果、HST-1タンパク濃度はコラーゲン濃度に反比例した。

#### 試験例7

Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液1mlをマウス腹腔内に投与した結果、投与後約12日目の血小板数が約2倍に増加し、その後減少し、約35日目に正常値に戻った。初回投与後37日目に再び実施例1で作成したコラーゲンを含む遺伝子製剤1.0mlを投与したところ、直ちに血小板が約2倍に増加し、その効果は持続した。その結果を図6に示した。

#### 比較例2

Adex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液1mlをマウス腹腔内に投与し、投与後37日目に再びAdex1 HST-1  $10^9$  pfu を含む培養液1mlを投与した。その結果、初回投与後約12日目の血小板数が約2倍に増加し、その後減少し、約35日目に正常値に戻り、Adex1 HST-1の再投与により血小板は増加しなかった。その結果を図6に示した。

試験例7および比較例2の結果から、アデノウィルスベクターは中和抗体の出現により繰り返し投与が非常に困難であるのに対し、実施例1で作



成した遺伝子製剤は複数回投与が可能であることが判った。

#### 発明の効果

本発明の遺伝子製剤は、遺伝子ベクター等を徐放することができると同時に、その徐放する間、生体内で、遺伝子を組み込んだベクター等を安定に保持することができる。従って、細胞とベクターとの接触を遅延させて細胞内への遺伝子導入時期をコントロールすることで、一回の投与による遺伝子発現時期を長期化することができる。

また、本発明の遺伝子製剤は、生体での中和抗体の出現により複数回投与が困難であった遺伝子ベクター、例えばウィルスベクター等において、複数回投与が可能である。

さらに、本発明の遺伝子製剤は、治療の終了を希望するときは遺伝子製剤を取り除くことができ、遺伝子の発現調節が可能である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、試験例1および比較例1における血小板数の経時変化を示すグラフ。

図2は、試験例1および比較例1における末梢血中のH S T-1の経時変化を示すグラフ。

図3は、試験例4および比較例1における血小板数の経時変化を示すグラフ。

図4は、試験例5における血小板数の経時変化を示すグラフ。

図5は、試験例6における末梢血中のH S T-1量のコラーゲン濃度依存性を示すグラフ。

図6は、試験例7および比較例2における血小板数の経時変化を示すグラフ。

## 請 求 の 範 囲

1. 所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤。
2. 生体親和性材料が、コラーゲン、ゼラチン、フィブリン、アルブミン、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キチン、キトサン、アルギン酸、ペクチン、アガロース、ハイドロキシアパタイト、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリジメチルシロキサン、またはグリコール酸、乳酸もしくはアミノ酸の重合体もしくはこれらの共重合体、またはこれらの生体親和性材料の2種類以上の混合物である請求項1記載の遺伝子製剤。
3. 所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、コラーゲンを含む生体親和性材料からなる担体に担持させた遺伝子製剤。
4. 所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、コラーゲンからなる担体に担持させた遺伝子製剤。
5. 遺伝子製剤を生体内に入れた状態において、その状態の遺伝子製剤の中の生体親和性材料の含量が、0.01～25 w/w%である請求項1記載の遺伝子製剤。
6. 溶液状、懸濁液状、含水のゲル状、フィルム状、スポンジ状、棒状、または球状である請求項1記載の遺伝子製剤。
7. ベクターが、ウィルスベクター、リポソームベクター、またはウィルスとリポソームによる融合リポソームベクターである請求項1記載の遺伝子製剤。
8. ベクターが、ウィルスベクターである請求項1記載の遺伝子製剤。
9. ベクターが、アデノウィルスベクターである請求項1記載の遺伝子製剤。

10. 所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させ、その担持させたものをその遺伝子ベクターまたは遺伝子が透過できる容器に入れた遺伝子製剤。

11. 所望の遺伝子を組み込んだベクターまたは遺伝子を、生体親和性材料からなる担体に担持させた製剤を生体に投与することからなる遺伝子で生体を治療する方法。

図1

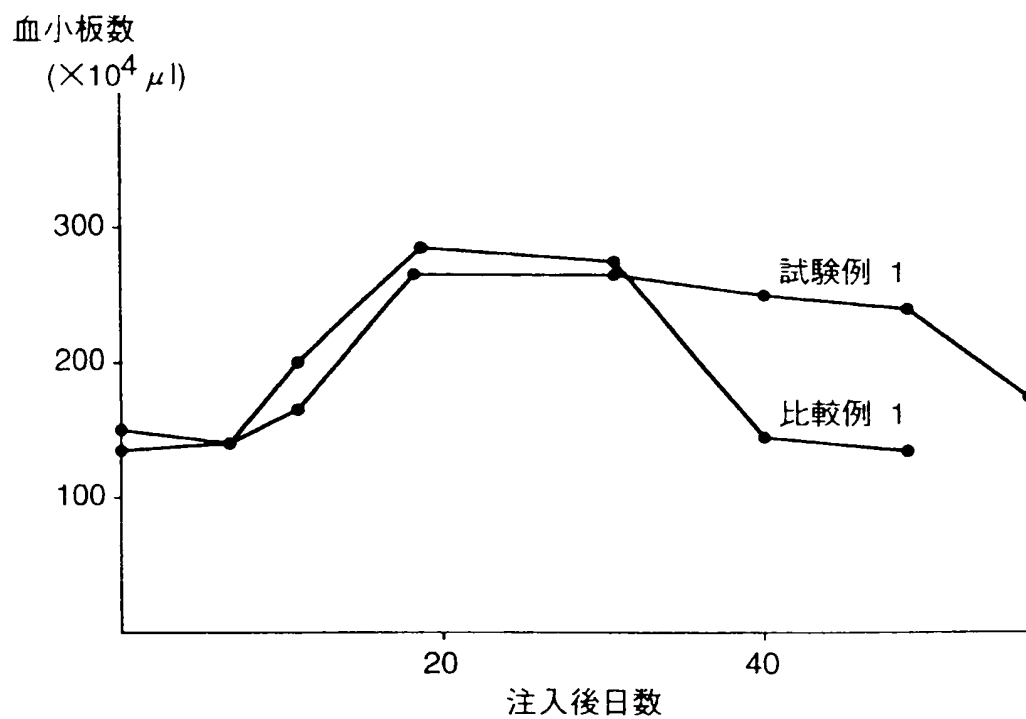


図2

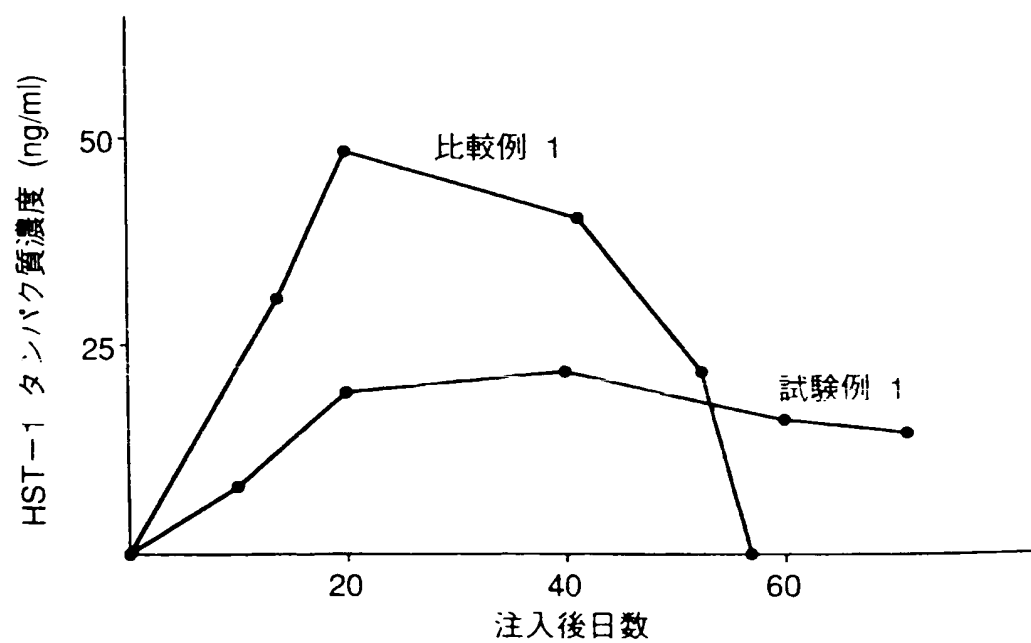


図3

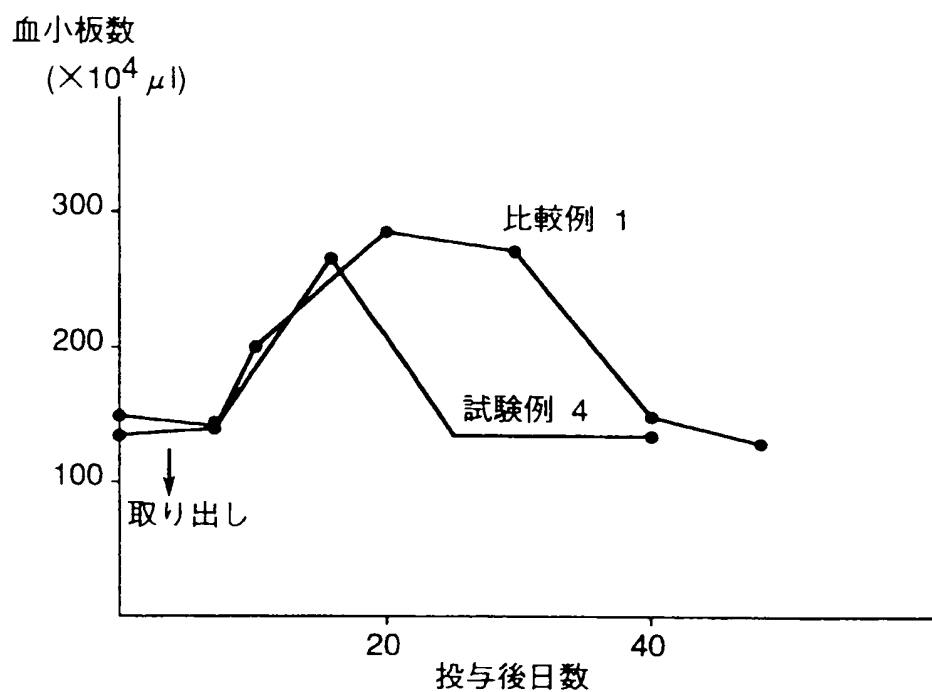
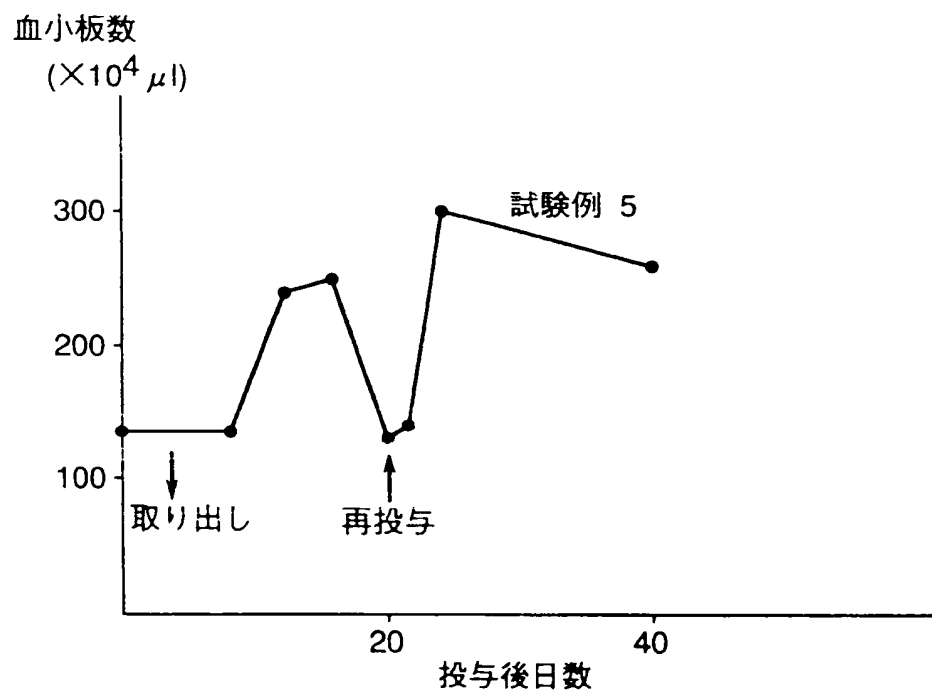


図4



## 図5

アテロコラーゲンインプラントによる Adex 1 HST-1の移送

注入5日目の HST-1血清濃度 (ng/ml)

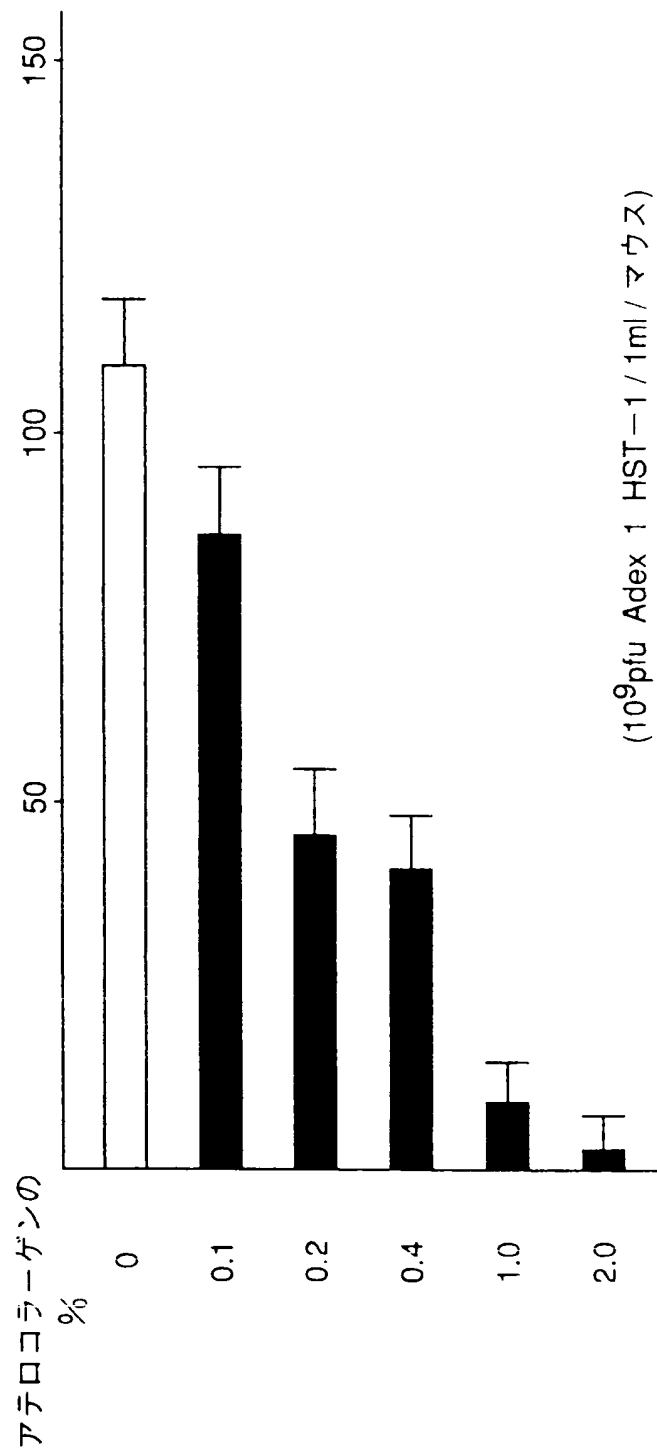
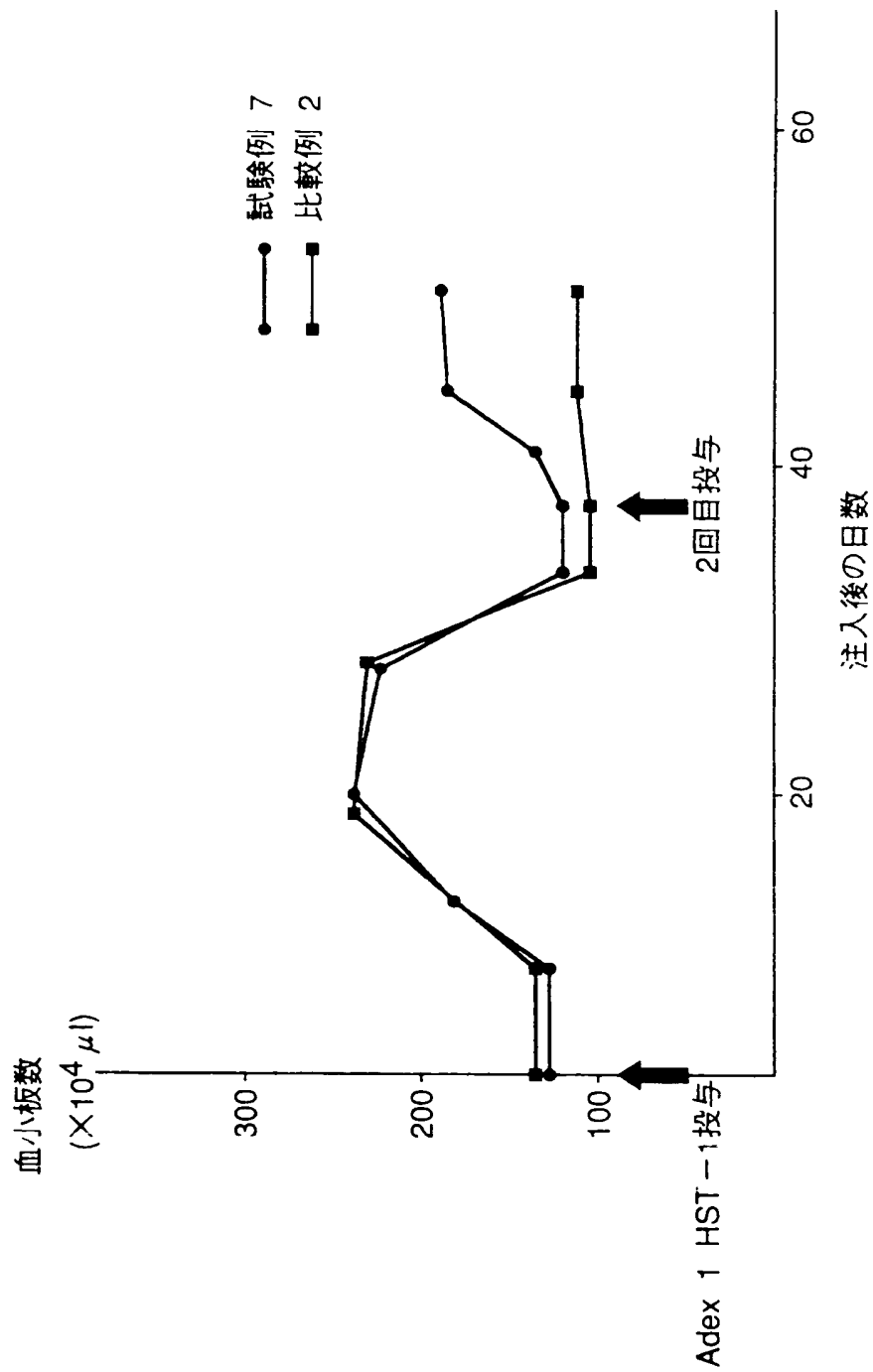


図6 アテロコラーゲンインプラントによる Adex 1 HST-1の繰り返し投与



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01824

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K48/00, 9/127, 31/70, 35/76, 47/02, 47/32, 47/34, 47/36, 47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K48/00, 9/127, 31/70, 35/76, 47/02, 47/32, 47/34, 47/36, 47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 62-228028, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd. and another), October 6, 1987 (06. 10. 87) & EP, 230647, A & US, 4849141, A	1 - 10
Y	JP, 3-163032, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), July 15, 1991 (15. 07. 91) & EP, 412554, A	1 - 10
Y	JP, 3-93716, A (Koken K.K.), April 18, 1991 (18. 04. 91) (Family: none)	1 - 10
Y	JP, 61-236729, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), October 22, 1986 (22. 10. 86) & US, 4774091, A	1 - 10
Y	JP, 60-126217, A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), July 5, 1985 (05. 07. 85) & EP, 139286, A	1 - 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 19, 1996 (19. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

October 1, 1996 (01. 10. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01824

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 92/20400, A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd. and another), November 26, 1992 (26. 11. 92) & JP, 4-509656, A & EP, 586700, A	1 - 10
Y	JP, 1-68278, A (Hoechst AG.), March 14, 1989 (14. 03. 89) & EP, 304700, A & US, 4941874, A	1 - 10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01824

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 11 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 96/01824

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>6</sup> A 61 K 48/00, 9/127, 31/70, 35/76, 47/02, 47/32, 47/34,  
47/36, 47/42

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>6</sup> A 61 K 48/00, 9/127, 31/70, 35/76, 47/02, 47/32, 47/34,  
47/36, 47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 62-228028, A, (住友製薬株式会社 他) 6. 10月. 1987 (06. 10. 87) & E P, 230647, A, & U S, 4849141, A	1-10
Y	J P, 3-163032, A, (住友製薬株式会社) 15. 7月. 1991 (15. 07. 91) & E P, 412554, A	1-10
Y	J P, 3-93716, A, (株式会社高研) 18. 4月. 1991 (18. 04. 91) (ファミリーなし)	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 96

国際調査報告の発送日

01:10:96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司

印

4 C

8314

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 61-236729, A, (住友製薬株式会社) 22. 10月. 1986 (22. 10. 86) &US, 4774091, A	1-10
Y	JP, 60-126217, A, (住友化学工業株式会社) 5. 7月. 1985 (05. 07. 85) &EP, 139286, A	1-10
Y	WO, 92/20400, A, (住友製薬株式会社 他) 26. 11月. 1992 (26. 11. 92) &JP, 4-509656, A, &EP, 586700, A	1-10
Y	JP, 1-68278, A, (ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト) 14. 3月. 1989 (14. 03. 89) &EP, 304700, A, &US, 4941874, A	1-10

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲11は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。